



TITLE:

Analysis of mitochondrial function in human induced pluripotent stem cells from patients with mitochondrial diabetes due to the A3243G mutation( Abstract\_要旨 )

AUTHOR(S):

Matsubara, Masaki

---

CITATION:

Matsubara, Masaki. Analysis of mitochondrial function in human induced pluripotent stem cells from patients with mitochondrial diabetes due to the A3243G mutation. 京都大学, 2018, 博士(医学)

ISSUE DATE:

2018-05-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.r13194>

RIGHT:

京都大学	博士（医学）	氏 名	松原 正樹
論文題目	Analysis of mitochondrial function in human induced pluripotent stem cells from patients with mitochondrial diabetes due to the A3243G mutation（A3243G 変異を有するミトコンドリア糖尿病患者由来 iPS 細胞のミトコンドリア機能解析）		
（論文内容の要旨）			
【背景、目的】			
患者由来の疾患特異的 iPS 細胞は、新規治療法の開発などに期待されている。mtDNA 異常に起因するミトコンドリア(mt)糖尿病において、最も多い変異の 1 つである A3243G 変異を有する mt 糖尿病患者 2 症例から iPS 細胞を樹立した過程で、同一患者より mtDNA 変異比率が検出感度（2%）未満のクローンと、高度（70%以上）なクローンが得られることを報告した( <i>Diabetologia</i> 2012)。			
本研究では、mtDNA 変異比率が検出感度未満の iPS 細胞の細胞治療への応用の可能性を検討するために、同一の mt 糖尿病患者から得られた変異比率が高度な iPS 細胞と mt 機能を詳細に比較検討し、また正常対照の iPS 細胞、ES 細胞との比較検討も行った。			
【対象、方法】			
症例 1 は 38 歳男性で糖尿病、症例 2 は 46 歳女性で糖尿病、難聴、てんかん、心筋症を呈した。血球細胞の mtDNA 変異比率は、症例 1 で 24%、症例 2 で 24% であり、mt 糖尿病と診断した。iPS 細胞樹立に用いた線維芽細胞の変異比率は、症例 1 で 18%、症例 2 で 24%であった。			
症例 1 から得られた 4 クローン(変異比率が検出感度未満の 2 クローンと高度な 77%、91%のクローン)、症例 2 から得られた 4 クローン(変異比率が検出感度未満の 2 クローンと高度な 70%、85%のクローン) の同一症例由来のクローン間で mt 機能を比較検討した。また正常対照として健常者由来の 3 クローンの iPS 細胞と 1 クローンの ES 細胞を、2 症例の変異比率が検出感度未満のクローンと比較検討した。mt 機能は以下を評価した。(1)complex I 活性：NADH の酸化反応を評価した。(2)mt 膜電位：TMRE を用い FACS により評価した。(3)酸素消費速度（OCR）：細胞外フラックスアナライザーを用い、基礎呼吸・予備呼吸能・ATP 産生・プロトンリークに寄与する OCR を評価した。(4) mt の ATP 産生：FRET を原理とした ATP プローブを用い、解糖系阻害剤 2DG を投与して評価した。			
【結果】			
症例 1 では、complex I 活性、基礎呼吸・予備呼吸能・ATP 産生に寄与する OCR、mt の ATP 産生は、mtDNA 変異比率が検出感度未満のクローンと比較して、高度なクローンで低下していた。脱共役剤 FCCP 投与下の mt 膜電位は、変異比率に比例して減少する傾向を認めた。以上より、症例 1 の変異比率が検出感度未満のクローンの mt 機能は、高度なクローンよりも優れていることが示唆された。			
症例 2 では、complex I 活性は、最も変異比率が高度（85%）なクローンで他のクローンよりも低下していた。mt 機能において閾値効果の存在が示唆されており、閾値が変異比率 70%と 85%の間に存在すると推測された。症例 2 の他の指標は、症例 1 と異なり、変異比率の異なるクローン間で差を認めず、核ゲノムの違いにより mt 機能の代償の程度が異なる可能性が考えられた。			

<p>2 症例の変異比率が検出感度未満のクローンでは、complex I 活性と、基礎呼吸・予備呼吸能・ATP 産生に寄与する OCR は、正常対照の測定値の範囲内であった。2 症例ともに変異比率が検出感度未満のクローンの mt 機能は、健常者由来の 3 クローンの iPS 細胞と同等であると考えられた。</p> <p>【考察】</p> <p>本研究により、mt 糖尿病患者から樹立する際に得られた mtDNA 変異比率が検出感度未満の iPS 細胞は、健常者由来の iPS 細胞と同程度の mt 機能を有すること、また同細胞の細胞治療への応用の可能性が示唆された。</p> <p>（論文審査の結果の要旨）</p> <p>ミトコンドリア（mt）DNA の A3243G 変異を有する mt 糖尿病患者 2 症例から iPS 細胞を樹立した過程で、同一患者より mtDNA 変異比率が検出感度（2%）未満の iPS 細胞と、高度（70%以上）の iPS 細胞が得られた。本研究では、mtDNA 変異比率と mt 機能の関連を明らかにするために、同一症例間で変異比率の異なる iPS 細胞、さらに 2 症例から得られた変異比率が検出感度未満の iPS 細胞と健常者由来の iPS 細胞、ES 細胞とで mt 機能の比較検討を行った。</p> <p>症例 1 では、mt の complex I 活性、脱共役剤投与下の膜電位、基礎呼吸・予備呼吸能・ATP 産生に寄与する酸素消費速度（OCR）、ATP 産生は、いずれも変異比率に比例して減少、あるいは減少する傾向を認めた。症例 2 では、complex I 活性は、変異比率が最も高度（85%）のクローンのみ低下を認め、他の指標は、変異比率の違いによる差を認めなかった。2 症例の変異比率が検出感度未満のクローンでは、complex I 活性と基礎呼吸・予備呼吸能・ATP 産生に寄与する OCR は、正常対照としての健常者由来 iPS 細胞とほぼ同等であった。以上の結果から、A3243G 変異を有する患者から iPS 細胞樹立の過程で得られた変異比率が検出感度未満の iPS 細胞の mt 機能は、正常対照と同等と考えられ、この細胞を用いて正常機能を有する <math>\beta</math> 細胞への分化誘導の可能性をひらくものである。</p> <p>以上の研究は、ミトコンドリア糖尿病患者から得られた変異比率の異なる iPS 細胞のミトコンドリア機能の解明に貢献し、ミトコンドリア糖尿病の病態解明に寄与するところが多い。</p> <p>したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。</p> <p>なお、本学位授与申請者は、平成 30 年 4 月 3 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。</p>
要旨公開可能日：                      年                      月                      日 以降